

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
22 janvier 2004 (22.01.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/008144 A2(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
G01N 33/543(74) Mandataire : CABINET ORES; 36 rue de Saint Peters-  
bourg, F-75008 Paris (FR).(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002117(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 8 juillet 2003 (08.07.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/08608 9 juillet 2002 (09.07.2002) FR(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COM-  
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];  
31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR).

## Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MOREL,  
Nathalie [FR/FR]; 58 rue Benoît Malon, F-94250 Gentilly  
(FR); CREMINON, Christophe [FR/FR]; 30 avenue Saint  
Laurent, Bâtiment C2, F-91400 Orsay (FR); GRASSI,  
Jacques [FR/FR]; 26 avenue des Tilleuls, F-91440 Bures  
sur Yvette (FR).En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.(54) Title: METHOD CAPABLE OF BEING AUTOMATED FOR DETECTION OF PrP<sup>res</sup> AND USES THEREOF(54) Titre : METHODE DE DETECTION AUTOMATISABLE DE LA PrP<sup>res</sup> ET SES APPLICATIONS(57) Abstract: The invention concerns a method capable of being automated for detecting PrP<sup>res</sup> in a biological sample and its uses. Said detection method uses a solid support whereon plasminogen is immobilized. It comprises essentially the following steps: (a) a step which consists in preparing the biological sample during which the latter is incubated on a homogenizing buffer which comprises an ionic or nonionic surfactant, a glucose-containing buffer, a saccharose-based buffer and a PBS buffer or in a capture buffer comprising an ionic surfactant; said step optionally comprises incubation with a proteinase K at a final concentration ranging between 1 and 8 µg/ml, preferably at a final concentration ranging between 2 and 4 µg/ml; (b) a step which consists in capturing the PrP<sup>res</sup> on said solid support, which must necessarily be carried out in the presence of a capture buffer, as defined above; (c) a controlled denaturation step of the PrP<sup>res</sup> fixed on said support comprising incubation with a denaturation buffer including at least one chaotropic agent, at a temperature ranging between room temperature and 100 °C; (d) a step which consists in detecting the denatured PrP<sup>res</sup> fixed on said support with a PrP protein-specific antibody.(57) Abrégé : Procédé de détection automatisable de la PrP<sup>res</sup> dans un échantillon biologique ainsi que ses applications. Ledit procédé de détection met en œuvre un support solide sur lequel est immobilisé du plasminogène. Il comprend essentiellement les étapes suivantes : (a) une étape de préparation de l'échantillon biologique au cours de laquelle ce dernier est incubé dans un tampon d'homogénéisation qui comprend un agent tensioactif ionique ou non-ionique, un tampon glucosé, un tampon à base de saccharose et un tampon PBS ou dans un tampon de capture comprenant un agent tensioactif ionique ; cette étape comprend optionnellement l'incubation avec une protéinase K à une concentration finale comprise entre 1 et 8 µg/ml, de préférence à une concentration finale comprise entre 2 et 4 µg/ml ; (b) une étape de capture de la PrP<sup>res</sup> sur ledit support solide, effectuée obligatoirement en présence d'un tampon de capture, tel que défini ci-dessus ; (c) une étape de dénaturation ménagée de la PrP<sup>res</sup> fixée sur ledit support comprenant une incubation avec un tampon de dénaturation comprenant au moins un agent chaotrope, à une température comprise entre la température ambiante et 100°C et (d) une étape de détection de la PrP<sup>res</sup> dénaturée et fixée sur ledit support avec un anticorps spécifique de la protéine PrP.

## MÉTHODE DE DÉTECTION AUTOMATISABLE DE LA PrP<sup>res</sup> ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de détection sensible, rapide, simple et entièrement automatisable de la PrP<sup>res</sup> dans un échantillon biologique ainsi qu'à ses applications.

Les encéphalopathies subaiguës spongiformes transmissibles (ESST) sont provoquées par des agents transmissibles non conventionnels (ATNC), encore appelés prions, dont la nature précise reste contestée à ce jour. Les ESST comprennent essentiellement la maladie de Creutzfeldt-Jakob, chez l'homme (MCJ ou CJD pour *Creutzfeldt-Jakob disease*), la tremblante chez le mouton et la chèvre et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB ou BSE pour *bovine spongiform encephalopathy*) chez les bovins ; d'autres encéphalopathies ont été mises en évidence chez les félinés, chez le vison ou certains ruminants sauvages, tels que le cerf.

Ces maladies sont d'évolution constamment fatale et il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement efficace.

Dans les ESST, on observe couramment, pendant la phase clinique de la maladie, une accumulation d'une protéine de l'hôte, la PrP (ou protéine du prion), sous une forme anormale (PrP<sup>res</sup>), principalement dans le système nerveux central sous la forme d'agrégats amorphes ou de plaques amyloïdes. La PrP<sup>res</sup> copurifie avec l'infectiosité et son accumulation précède l'apparition des lésions histologiques. *In vitro*, elle est toxique pour des cultures de neurones.

Les deux isoformes de la PrP présentent la même séquence en acides aminés, mais diffèrent dans leur structure secondaire : la PrP<sup>res</sup> présente un contenu significativement plus élevé en feuillets  $\beta$  plissés, alors que la PrP normale (PrP<sup>sens</sup>) présente un plus grand pourcentage d'hélices  $\alpha$ .

L'isoforme infectieuse PrP<sup>res</sup> est capable de convertir la protéine normale, c'est-à-dire la PrP<sup>sens</sup>, en protéine infectieuse.

Deux propriétés biochimiques permettent, généralement, de distinguer ces deux isoformes.

- la PrP<sup>res</sup> est partiellement résistante aux protéases, notamment à la protéinase K (PK), qui entraîne un clivage de son extrémité N-terminale. Après action

de la PK, la PrP<sup>res</sup> est souvent appelée PrP27-30 à cause du poids moléculaire apparent de la forme biglycosylée ; il est généralement admis que le site de clivage de la PrP<sup>res</sup> se situe entre les acides aminés 89 et 90 (Prusiner et al, Cell, 1984) pour les souches habituelles.

- 5                   - la PrP<sup>res</sup> est insoluble et s'agrège dans les détergents non-ioniques, tels que le Triton X100 ou le Triton 114 en formant des fibres amyloïdes (Scrapie Associated fibrils, SAFs).

La forme normale de la protéine du prion (PrP<sup>scns</sup>) est, en principe, complètement dégradée par les protéases et est parfaitement soluble en présence de  
10 détergents non-ioniques.

Pour déceler la présence de l'agent infectieux, la plupart des méthodes sont fondées sur une détection sélective de la PrP anormale (PrP<sup>res</sup>), liée à l'agent infectieux, en tirant profit de sa résistance partielle aux protéases et de ses propriétés d'agrégation.

- 15                   Toutefois, bien que la PrP<sup>res</sup> et la PrP<sup>scns</sup> diffèrent par leurs propriétés physiques, il est en fait très difficile de développer des tests immunologiques qui permettent de différencier de manière fiable les deux isoformes de la PrP, notamment en raison de l'absence d'anticorps spécifiques de la PrP<sup>res</sup>. En effet, à ce jour, les seuls anticorps disponibles reconnaissent soit la PrP<sup>scns</sup> soit les deux formes de la PrP (sens  
20 ou res) après qu'elles aient subi une étape de dénaturation. C'est la raison pour laquelle dans presque tous les tests immunologiques dédiés au diagnostic des ESSTs on retrouve une étape de dénaturation afin de permettre la détection immunologique de la PrP<sup>res</sup>.

Les cinq grandes méthodes conventionnellement utilisées pour le  
25 diagnostic des ESSTs sont :

1. l'histopathologie, qui vise à détecter (essentiellement dans des  
tissus nerveux centraux) les lésions caractéristiques des ESSTs (spongiose, vacuolisation, astrogliose, plaques amyloïdes PrP) ; elle reste une méthode de référence pour la confirmation d'un diagnostic clinique. Elle est très spécifique puisqu'elle permet  
30 d'observer directement les stigmates de la maladie. Cependant, on sait maintenant qu'elle est moins sensible que d'autres techniques. Cette méthode a l'inconvénient de

ne pas permettre un diagnostic pré-clinique, dans la mesure où les lésions anatomiques apparaissent tardivement dans l'histoire de la maladie. De plus elle n'est pas du tout adaptée à une analyse en grandes séries.

2. l'immunohistochimie, qui permet de détecter les plaques amyloïdes ou les dépôts de PrP<sup>res</sup> à l'aide d'anticorps spécifiques de la PrP. La sensibilité de l'observation au microscope peut, en effet, être augmentée de façon significative grâce à cette approche. Ces techniques font certainement partie des méthodes les plus sensibles aujourd'hui mais elles restent lourdes et sont surtout utilisées comme méthodes de confirmation.

10 3. la détection des fibres amyloïdes par microscopie électronique. Cette méthode a l'inconvénient d'être peu sensible et lourde à mettre en œuvre. Elle est aujourd'hui quasiment abandonnée.

4. les bio-essais qui visent à identifier le caractère infectieux d'un échantillon. En effet, la méthode la plus sensible pour le diagnostic des ESSTs est, sans conteste, l'infection expérimentale chez l'animal de laboratoire. Cette méthode consiste à injecter chez un animal un homogénat préparé à partir du tissu étudié et à surveiller l'apparition des signes cliniques. Le développement de cette maladie expérimentale sera confirmé à l'aide de techniques classiques (histologie, immunohistologie, Western-blot). Pour des raisons pratiques évidentes, ces expériences sont généralement réalisées sur des rongeurs (souris, hamster) mais dans certains cas extrêmes, des infections expérimentales ont été réalisées avec des ovins ou des bovins. L'efficacité de la transmission expérimentale dépend de nombreux facteurs et notamment : de la barrière d'espèce, de la quantité d'agent transmissible inoculée, de la souche de prion, de la sensibilité de l'espèce réceptrice et de la voie d'inoculation. La voie la plus efficace est la voie intra-crânienne, puis la voie intraveineuse (10 fois moins efficace). La voie la moins efficace est la voie orale (100.000 fois moins efficace que la voie intra-crânienne). Ainsi, le moyen le plus sensible pour détecter l'agent transmissible responsable de l'ESB est l'injection intra-crânienne chez le bovin. Les principaux inconvénients de ces méthodes sont, d'une part leur lourdeur et d'autre part leur durée. En effet, il faut compter entre 300 et 700 jours pour réaliser un test d'infection expérimental chez la souris et entre 3 et 10 ans chez les bovins. La dispo-

nibilité de souris transgéniques exprimant la même PrP que celle de l'espèce donneuse va permettre de raccourcir ces délais mais, dans tous les cas, ces tests dureront, au moins trois mois.

5 5. les méthodes de Western-blot qui reposent sur la détection immunologique de la PrP<sup>res</sup> dans un extrait de tissu, après traitement de l'extrait par une protéase (PK, par exemple), de façon à détruire l'isoforme normale de la PrP (PrP<sup>sens</sup>), séparation des protéines de l'extrait par électrophorèse, transfert sur une membrane de polymère, et détection par un anticorps spécifique reconnaissant la PrP (Schaller O. et al., Acta Neuropathol (Berl), 1999, 98, 437-443). Pour les raisons expliquées ci-

10 dessus, la digestion par une protéase est nécessaire, dans la mesure où pour effectuer une analyse par Western-blot, la protéine est dénaturée, ce qui implique qu'il n'existe plus de différence entre la forme normale (PrP<sup>sens</sup>) et la forme pathologique (PrP<sup>res</sup>) de la protéine prion. La digestion à la PK pallie cet inconvénient, la PrP<sup>sens</sup> étant complètement digérée, alors que la PrP<sup>res</sup> est peu modifiée. La spécificité de cette

15 approche tient, entre autre, au fait que sous l'action de la protéinase K, le poids moléculaire de la PrP<sup>res</sup> est modifié de façon caractéristique en raison de la dégradation partielle de la partie N-terminale de la protéine. Sa sensibilité est du même ordre de grandeur que celle de l'immunohistologie. Le principal inconvénient de cette technique est lié à sa difficulté de mise en œuvre, à la durée de l'analyse (> 8 heures)

20 et à l'impossibilité de l'automatiser.

Plus récemment des tests de type ELISA ont été décrits. Parmi ceux ci, certains font intervenir un traitement des extraits de tissus par une protéase, on peut citer :

- celui décrit par Serban et al. (Neurology, 1990, 40, 110), qui ont

25 développé un test de détection de la PrP<sup>res</sup> qui inclut l'immobilisation des protéines sur une membrane de nitrocellulose, suivie d'une digestion protéasique, d'une dénaturation et d'une immunodétection avec des anticorps monoclonaux.

- celui décrit par Oesch et al. (Biochemistry, 1994, 33, 5926-5931), qui ont proposé, pour quantifier la quantité de PrP<sup>res</sup>, un test d'immunofiltration pour

30 la purification de la PrP<sup>res</sup> (ELIFA ou *enzyme-linked immunofiltration assay*).

- celui décrit par Gratwohl et al., 1997, qui proposent un dosage de type ELISA. Après traitement des échantillons à la protéinase K et purification de la PrP<sup>res</sup> par centrifugation, celle-ci est adsorbée sur des plaques de microtitration et détectée à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin.

5           Aucune des méthodes citées ci-dessus n'est véritablement adaptée à un criblage à haut débit et ne peut se prêter à une automatisation. Après la première "crise de la vache folle" en 1996 et la prise en considération d'une possible transmission de cette maladie à l'homme, le besoin s'est fait sentir de développer de nouvelles approches diagnostiques, plus simples et plus rapides. Ces méthodes devront permet-  
10   tre soit d'effectuer des études épidémiologiques à grande échelle, afin d'évaluer plus précisément les caractéristiques de l'épizootie, soit de tester systématiquement, à l'abattoir par exemple, l'ensemble des animaux avant leur entrée dans la chaîne alimentaire ou les circuits industriels. Ainsi s'est développée une nouvelle génération de tests diagnostiques, dits rapides, qui sont tous fondés sur la détection immuno-  
15   logique de la PrP<sup>res</sup>.

          En mai 1998, la Direction Générale XXIV de la Commission Européenne (Politique des consommateurs et protection de leur santé) a émis un appel d'offre mondial visant à recenser les techniques capables d'effectuer un criblage à haut débit de la BSE et susceptibles de donner lieu rapidement à un développement indus-  
20   triel. A l'issue de cet appel d'offre (juin 1998) quatre tests ont été sélectionnés. Trois d'entre eux ont été mis au point par des sociétés industrielles : Enfer Technology Ltd (Irlande) (Demandes Internationales PCT WO 98/35236, au nom de Enfer Technology Ltd et WO 93/11155, au nom de Proteus Molecular Design Limited), Prionics (Suisse) (Demande Internationale PCT WO 99/15651) et E.G. & G. Wallace (Grande Bretagne)  
25   (Demande Internationale WO 00/29850), le quatrième a été développé dans deux laboratoires du CEA (France). Ces quatre tests ont pour but de détecter dans le cerveau des animaux la présence de PrP<sup>res</sup>. Tous font intervenir un traitement des extraits de cerveaux par la protéinase K de façon à détruire la PrP<sup>sens</sup> et permettre une mesure sélective de la PrP<sup>res</sup>. Le test de Prionics utilise la technique du Western-blot  
30   sous une forme industrialisée alors que les tests développés par Enfer Technology et Wallace sont des dosages enzymoimmunologiques de type ELISA. Le test développé

par le CEA implique d'abord une purification sélective de la PrP<sup>res</sup> qui est ensuite dosée à l'aide d'un dosage sandwich utilisant deux anticorps monoclonaux (dosage enzymo-immunométrique à deux sites). Cette étude a montré que trois des tests évalués (Prionics, Enfer et CEA) possédaient une excellente capacité à détecter  
5 spécifiquement les bovins au stade clinique de la maladie. Par ailleurs, le test développé par le CEA a démontré qu'il était significativement plus sensible que celui des concurrents en raison notamment de l'étape de purification/concentration de la PrP<sup>res</sup> (Moynagh et al., Nature, 1999, 400, 105 ; <http://europa.eu.int/comm/dg24/health/>).

10 Ainsi, la Demanderesse a proposé un test pour la détection quantitative de la PrP<sup>res</sup>, qui comprend une étape de purification qui conduit à une détection significativement plus sensible ; ce test est notamment décrit dans la Demande Internationale PCT WO 99/41280 et dans un Rapport préliminaire de la Direction Générale XXIV de la Commission Européenne (Politique des consommateurs et protection de  
15 leur santé ; <http://europa.eu.int/comm/dg24/health/>) ; elle a également proposé, dans la Demande Internationale PCT WO 01/35104 une méthode de diagnostic qui outre la possibilité de purification évoquée ci-dessus, met en œuvre un traitement de l'échantillon biologique avec une protéase, de manière à dégrader complètement la PrP<sup>sens</sup> dans des conditions où tout ou partie des motifs octapeptides répétés de la  
20 PrP<sup>res</sup> sont conservés ; ceci permet de détecter la PrP<sup>res</sup> à l'aide d'un anticorps anti-octapeptides, d'affinité élevée. Cette méthode est très sensible et très spécifique ; toutefois, le procédé de purification/concentration comprend plusieurs étapes et notamment une étape de centrifugation qui interdit toute automatisation totale du test.

Depuis 1999, ces tests rapides ont démontré leur utilité dans le cadre  
25 d'études épidémiologiques portant sur des populations à risque (animaux morts, abattus en urgence ou euthanasiés pour maladie). Depuis le début de l'année 2001, ils sont utilisés à très grande échelle, pour tester tous les bovins de plus de 24 ou 30 mois entrant dans la chaîne alimentaire (8,5 millions de tests réalisés en 2001).

Aujourd'hui la priorité dans le domaine du diagnostic des maladies à  
30 prions est la mise au point d'un test *ante-mortem* et préclinique pour le variant de la maladie de Creutzfeldt-Jakob. L'objectif est d'abord de sécuriser la transfusion

sanguine et ensuite de détecter de façon précoce les personnes atteintes par cette maladie afin de pouvoir envisager la mise en place d'un traitement (qui n'existe pas à ce jour) avant la phase de neuroinvasion et l'apparition des premiers signes cliniques irréversibles. Ceci implique obligatoirement la mise au point d'un test sur un prélèvement de sang ou d'urine, les seuls fluides biologiques facilement prélevables de façon non invasive. Cet objectif apparaît réalisable puisque quelques publications font état de la présence de prions infectieux ou de PrP<sup>res</sup> dans le sang (Brown et al., Transfusion, 1999, 39, 1169-1178 ; Houston et al. The Lancet, 2000, 356, 999-1000 ; Schmerr et al., J. Chromat. A., 1999, 853, 207-214) ou dans l'urine (Shaked et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 31479-31482). Cependant, l'analyse de ce type d'échantillons pose des problèmes analytiques beaucoup plus difficiles à résoudre que ceux rencontrés pour analyser des tissus connus pour répliquer et accumuler la PrP<sup>res</sup> (cerveaux, tissus lymphoïdes). En effet, les données disponibles sur la physiopathologie des ESSTs montrent qu'en tout état de cause, la PrP<sup>res</sup> est au moins 100 fois moins concentrée dans le sang ou les urines que dans une rate ou un cerveau. D'autre part, il est probable que dans ces milieux (urine, cellules blanches du sang), les propriétés biochimiques de la PrP<sup>res</sup> soient différentes de celles observées dans les tissus où elle s'accumule de façon importante. Ses propriétés d'agrégation et sa résistance à la PK peuvent notamment être très diminuées. Il est possible, par exemple que les traitements à la protéinase K utilisés pour analyser un échantillon de cerveau, détruisent aussi les traces de PrP<sup>res</sup> contenues dans le sang. En conséquence, il faut développer pour analyser ce type d'échantillon des stratégies différentes de celles développées à ce jour.

Une des options possibles consiste à utiliser un ligand capable de reconnaître spécifiquement la PrP<sup>res</sup>. Ce ligand, immobilisé sur un support solide adéquat pourrait permettre de concentrer la PrP<sup>res</sup> dans les milieux, comme le sang ou l'urine dans lesquels elle est très peu concentrée. Dans la mesure où l'interaction entre le ligand et la PrP<sup>res</sup> est vraiment spécifique, un traitement à la protéinase K ne sera pas nécessaire, de même qu'il ne sera pas nécessaire de faire appel à ses propriétés d'agrégation.

Ce type de ligand a été décrit récemment par l'équipe d'Adriano Aguzzi (Fischer et al., Nature, 2000, 408, 479-483 ; Maissen et al., The Lancet, 2001,



357, 2026-2028) et a fait l'objet d'une Demande Internationale WO 01/23425. Dans cette Demande Internationale, pour permettre la détection de petites quantités de prion, il est proposé de concentrer la PrP<sup>res</sup> ou ses produits de digestion à la PK, par traitement de l'échantillon biologique concerné avec des billes magnétiques portant  
5 des sites de liaison aux prions : plasminogène purifié, fibrinogène, fraction I de précipitation au sulfate d'ammonium du sérum ou du plasma ou fraction II de précipitation au sulfate d'ammonium du sérum ou du plasma. La PrP<sup>res</sup> est donc d'abord concentrée par incubation avec des billes magnétiques portant du plasminogène ou du fibrinogène, puis détectée par analyse Western-blot, ELISA, immunoprécipitation, test  
10 BIACORE, test immunocytochimique ou test histoblot après élution de la PrP<sup>res</sup> du support solide. Dans cette méthode, les conditions sont les suivantes :

- étape de préparation de l'échantillon : homogénéisation et centrifugation de l'homogénat ; il est important d'utiliser, au cours de la première étape d'homogénéisation, des concentrations faibles en détergents ioniques, suivie d'une  
15 centrifugation à faible vitesse (500 g pendant 30 minutes), alors que dans les étapes suivantes des concentrations élevées en détergents non-ioniques sont mises en œuvre ; on obtient de préférence une concentration en protéine dans l'homogénat d'au plus 5 mg/ml ;

- digestion à la protéinase K : de préférence en présence de 50 µg/ml  
20 de PK, à 37°C, pendant au moins une demi-heure ;

- conditions d'incubation des billes magnétiques avec l'homogénat, dans un tampon non-ionique : environ 1 heure et demi à température ambiante.

- conditions de détection : pour réaliser cette opération, il y a tout d'abord lieu de procéder à une dénaturation des protéines fixées, qui conduit à leur  
25 détachement des billes magnétiques : on procède en deux temps : lavage des billes avec un tampon de lavage comprenant du Tween 20 à 2 % et du NP-40 à 2 % dans du PBS, puis addition d'un tampon de chargement pour l'électrophorèse comprenant du Tris 50 mM, pH 6,8, du SDS à 2 %, du bleu de bromophénol à 0,01 % et du glycérol à 10 % et chauffage à 95 °C pendant 5 minutes. La PrP<sup>res</sup> dénaturée ainsi éluee du  
30 support solide contenant le plasminogène est ensuite analysée à l'aide d'un Western-blot. En effet, dans la mesure où il n'existe pas d'anticorps spécifique de la PrP<sup>res</sup>,

capables de la détecter quand elle est liée au plasminogène, il est nécessaire de rompre la liaison plasminogène/PrP<sup>res</sup> et donc de dénaturer la PrP<sup>res</sup>, pour la détecter sous forme dénaturée par une autre méthode, ce qui implique qu'elle est décrochée des billes. Une telle procédure est adaptée à l'analyse par Western-blot, mais pas du tout  
5 aux tests de type ELISA mettant en œuvre un support tel que des plaques de microtitration ou des billes magnétiques. En effet, les conditions utilisées dans la méthode décrite dans cette Demande Internationale WO 01/23425 (utilisation de SDS, notamment) du fait de la dissociation du complexe plasminogène/Prp<sup>res</sup> lors de sa dénaturation, impose une étape de liaison supplémentaire à un support solide. Il faut noter, en  
10 outre, que la méthode décrite dans cette Demande ne montre aucune capacité à concentrer la PrP<sup>res</sup> contenue dans un grand volume d'échantillon.

C'est pourquoi la Demanderesse s'est donnée pour but de pourvoir à un procédé de détection spécifique, sensible, simple et rapide de la PrP<sup>res</sup> qui réponde mieux aux objectifs actuels du diagnostic des ESSTs que les méthodes de détection de  
15 l'art antérieur, notamment :

- en ce qu'elle est d'utilisation facile, c'est-à-dire mieux adaptée aux conditions d'utilisation en routine et donc entièrement automatisable ; et

- en ce qu'elle est capable de purifier et de concentrer la PrP<sup>res</sup> sans faire appel à ses propriétés de résistance à la PK ou d'agrégation.

20 La présente invention a pour objet un procédé de détection de la PrP<sup>res</sup> dans un échantillon biologique, mettant en œuvre un support solide, notamment des billes magnétiques ou des plaques de microtitration, sur lequel est immobilisé du plasminogène, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend :

(a) une étape de préparation de l'échantillon biologique, lequel peut  
25 être constitué soit par un homogénat de tissu ou de cellules, soit par du sérum ou du plasma, soit par de l'urine, au cours de laquelle ce dernier est incubé dans un tampon sélectionné dans le groupe constitué par :

(i) des tampons d'homogénéisation de l'échantillon biologique comprenant (1) un tampon sélectionné dans le groupe constitué par les tampons  
30 comprenant au moins un agent tensioactif sélectionné dans le groupe constitué par les agents tensioactifs ioniques et les agents tensioactifs non-ioniques, un tampon glucosé,

un tampon à base de saccharose et un tampon PBS et (2) optionnellement, une protéinase K à une concentration finale comprise entre 1 et 8  $\mu\text{g/ml}$ , de préférence à une concentration finale comprise entre 2 et 4  $\mu\text{g/ml}$  et

- (ii) les tampons de capture comprenant au moins (1) un agent tensioactif sélectionné dans le groupe constitué par les agents tensioactifs ioniques et (2) optionnellement une protéinase K à une concentration finale comprise entre 1 et 8  $\mu\text{g/ml}$ , de préférence à une concentration finale comprise entre 2 et 4  $\mu\text{g/ml}$ .

Bien que dans les conditions de capture sélectionnées à l'étape (b) ci-après, le plasminogène reconnaisse de façon très préférentielle la  $\text{PrP}^{\text{res}}$ , dans certaines situations un traitement ménagé préalable avec la PK (c'est-à-dire au cours de l'étape (a) de préparation de l'échantillon biologique) permet de supprimer le signal lié à une reconnaissance résiduelle de la  $\text{PrP}^{\text{sens}}$ . C'est la raison pour laquelle on considère que la mise en œuvre ménagée de la PK à cette étape est optionnelle ; par ailleurs, dans les situations où l'on peut craindre que le traitement à la PK affecte la  $\text{PrP}^{\text{res}}$  (par exemple dans un échantillon sanguin ou d'urine), cette étape de traitement à la PK peut être supprimée.

Il est à noter que la concentration en PK mise en œuvre est beaucoup plus faible que celle utilisée dans la Demande Internationale WO 01/23425 (50  $\mu\text{g/ml}$ ) ou dans les autres tests utilisant la PK (couramment entre 40 et 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

- (b) une étape de capture de la  $\text{PrP}^{\text{res}}$  sur ledit support solide, effectuée obligatoirement en présence d'un tampon de capture tel que défini ci-dessus, sans PK, c'est-à-dire dans lequel les agents tensioactifs sont exclusivement des agents tensioactifs ioniques, par incubation de l'échantillon biologique obtenu à l'étape (a) avec ledit support sur lequel est immobilisé de façon covalente du plasminogène ; cette étape comprend, si nécessaire, préalablement à l'incubation, une dilution de l'échantillon biologique obtenu à l'étape (a) dans ledit tampon de capture, pour obtenir l'ajustement de la concentration en protéine, et ce notamment dans le cas où l'étape (a) a été mise en œuvre dans un tampon d'homogénéisation.

La concentration optimale en protéine dans l'échantillon biologique varie selon le milieu étudié. Dans le cas d'un homogénat de cerveau, il est préférable qu'elle ne dépasse pas environ 2  $\text{mg/ml}$  (correspondant à un homogénat à 2 % p/v)

sous peine d'observer une perte d'efficacité de la capture de la PrP<sup>res</sup>. Cette limitation est probablement liée à la présence dans l'échantillon de substances non caractérisées capables, elles aussi, de se lier au plasminogène. Elle constitue un inconvénient par rapport à d'autres méthodes de concentration (par exemple celle décrite dans la

5 Demande Internationale PCT WO 99/41280) qui permettent de traiter des homogénats plus concentrés (homogénat à 20% p/v soit environ 20 mg/ml de protéine).

(c) une étape de dénaturation ménagée de la PrP<sup>res</sup> fixée sur ledit support par l'intermédiaire du plasminogène, comprenant l'incubation de la PrP<sup>res</sup> avec un tampon de dénaturation comprenant au moins un agent chaotrope, à une température

10 ture comprise entre la température ambiante et 100°C.

Cette étape de dénaturation ménagée est compatible avec le maintien du complexe plasminogène/PrP<sup>res</sup>.

(d) une étape de détection de la PrP<sup>res</sup> dénaturée et fixée sur ledit support avec un anticorps spécifique de la protéine PrP.

15 Après l'étape (b) de capture, le support sur lequel est éventuellement fixé la PrP<sup>res</sup>, peut avantageusement être lavé ; les conditions de lavage et en particulier le tampon de lavage utilisé, ne sont pas critiques, dans le procédé selon l'invention.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon

20 l'invention, l'agent tensioactif ionique mis en œuvre au cours de l'étape (a) ou de l'étape (b) est sélectionné dans le groupe constitué par :

- des agents tensioactifs anioniques, tels que le SDS (dodécylsulfate de sodium), le sarkosyl (lauroyl-sarcosine), le cholate de sodium, le désoxycholate (DOC) de sodium, le taurocholate de sodium ; et
- 25 - des agents tensioactifs zwitterioniques, tels que le SB 3-10 (décyl-sulfobétaïne), le SB 3-12 (dodécyl-sulfobétaïne), le SB 3-14 (tétradécyl-sulfobétaïne), le SB 3-16 (hexadécyl-sulfobétaïne), le CHAPS et le désoxyCHAPS.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'agent tensioactif non-ionique, mis en œuvre au cours de l'étape (a) du

30 procédé selon l'invention, est sélectionné dans le groupe constitué par le C12E8 (dodécyl octaéthylène glycol), le Triton X100, le Triton X114, le Tween 20, le Tween

80, le MEGA 9 (nonanoyl méthyle glucamine), l'octylglucoside, le LDAO ( dodécyle diméthylamine oxyde) ou le NP40.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, la durée d'incubation de l'étape (a) est comprise entre 5 et 30 minutes à 5 37°C, de préférence pendant 10 minutes à 37°C.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, le tampon de capture comprend, de préférence, du sarkosyl à une concentration finale comprise entre 0,5 % et 2 % (p/v), de manière encore plus préférée à une concentration finale en sarkosyl de 1 % (p/v).

10 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, le tampon de capture comprend en outre un sel sélectionné de préférence parmi les sels de métaux alcalins, de préférence du chlorure de sodium, de manière encore plus préférée, à une concentration comprise entre 0,15 M et 0,5 M.

15 Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, le tampon de capture comprend en outre une protéine et de manière encore plus préférée, de la sérumalbumine bovine à une concentration de 0,2 mg/ml.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, la durée d'incubation de l'étape (b) est comprise entre 1 heure et 4 heures 20. à température ambiante.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de l'invention, l'agent chaotrope mis en œuvre au cours de l'étape (c) de dénaturation ménagée est sélectionné dans le groupe constitué par l'urée, un sel de guanidine, tel que le chlorhydrate de guanidine ou le thiocyanate de guanidine et le thiocyanate de sodium 25 ou un mélange de ceux-ci.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, la durée d'incubation de l'étape (c) est comprise entre 10 et 60 minutes, de préférence soit pendant 30 minutes à 37°C avec les plaques de microtitration soit pendant 10 minutes à 100°C avec les billes magnétiques.

30 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux du procédé selon l'invention, l'anticorps traceur de l'étape (d) est un anticorps polyclonal ou mono-

clonal sélectionné dans le groupe constitué par les anticorps SAF et les anticorps anti-PrP recombinante ; de manière plus précise, les anticorps SAF et plus particulièrement les anticorps SAF-34, SAF-53 et SAF-61 ont été obtenus en immunisant des souris invalidées pour le gène de la PrP avec des SAFs de hamster dénaturés (Demart et al.,  
5 Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, 265,652-657). Les anticorps BAR-221, BAR-224 et BAR-233 ont été obtenus en immunisant des souris invalidées pour le gène de la PrP avec une PrP recombinante de mouton. L'anticorps 8G8 a été obtenu en immunisant des souris invalidées pour le gène de la PrP avec une PrP recombinante humaine (Krasemann et al., J. Immunol. Methods, 1996, 199,109-118 et Mol. Med.,  
10 1996, 2, 725-734).

Conformément à l'invention, le support solide est avantageusement sélectionné dans le groupe constitué par les billes magnétiques et les plaques de microtitration.

De manière surprenante, le fait que l'échantillon biologique :

15 - est, si nécessaire, homogénéisé dans un tampon d'homogénéisation comprenant éventuellement de la PK, à des concentrations très faibles (entre 1 et 8 µg/ml),

- est incubé dans un tampon de capture ne contenant comme agent tensioactif exclusivement des agents tensioactifs ioniques,

20 - est mis en contact avec un support solide, sur lequel est fixé, de manière covalente, du plasminogène,

- puis est soumis à une étape de dénaturation ménagée qui également de manière surprenante n'entraîne pas la destruction de la liaison PrP<sup>res</sup>-plasminogène, permet une fixation sélective de la PrP<sup>res</sup> sur le support solide et un dosage direct de la  
25 PrP<sup>res</sup> sur le support solide, sans nécessiter d'étapes supplémentaires.

Un tel procédé permet d'effectuer un dosage continu complètement automatisable, à la différence du procédé décrit dans la demande internationale PCT WO 99/41280 qui requiert une étape de centrifugation. Un tel dosage présente, en outre, une sensibilité au moins aussi bonne que celle obtenue avec les méthodes  
30 mettant en œuvre une étape de purification, telles que décrites dans la Demande Internationale PCT WO 99/41280.

La présente invention a également pour objet une trousse de diagnostic pour la mise en œuvre du procédé tel que défini ci-dessus, caractérisée en ce qu'elle comprend en association :

- 5                   - au moins un tampon d'homogénéisation, tel que défini ci-dessus,
- au moins un tampon de capture tel que défini ci-dessus,
- au moins un tampon de dénaturation tel que défini ci-dessus,
- une protéinase K à une concentration finale comprise entre 1 et 8 µg/ml, de préférence à une concentration finale comprise entre 2 et 4 µg/ml, et
- 10               - un support solide sur lequel est lié, de manière covalente, du plasminogène.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs du procédé selon l'invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- 15               - la Figure 1 illustre l'effet de la concentration en protéinase K sur le rapport signal CP (contrôle positif) sur CN (contrôle négatif).
- la Figure 2 représente une étude comparative de la détection de la PrP<sup>res</sup> de mouton à l'aide d'un dosage « sandwich » classique (BAR-224/SAF-34) ou avec le couple plasminogène/BAR224.
- 20               - la Figure 3 représente une étude comparative du dosage de la PrP<sup>res</sup> de mouton atteint de la tremblante en utilisant la technique décrite dans la Demande Internationale WO 99/41280 ou la méthode selon l'invention : dosage « sandwich » plasminogène/BAR224 sur plaque de microtitration.
- la Figure 4 représente une étude comparative du dosage direct
- 25               (invention) et du dosage indirect (méthode selon la Demande Internationale WO 01/23425) de la PrP<sup>res</sup> de mouton atteint de la tremblante : comparaison des conditions de capture par le plasminogène immobilisé sur des billes magnétiques selon l'invention ou selon la Demande Internationale WO 01/23425.
- la Figure 5 illustre la comparaison de la détection de la PrP<sup>res</sup> utilisant la technique de préparation de SAFs suivie par un dosage immunométrique
- 30

(Demande Internationale PCT WO 99/41280) avec celle utilisant la capture de la PrP<sup>res</sup> sur des billes couplées au plasminogène suivie d'un dosage direct (invention).

- la Figure 6 représente l'effet de la dilution d'un homogénat de cerveau de mouton atteint de la tremblante sur la détection de la PrP<sup>res</sup> par dosage direct sur du plasminogène couplé à des billes magnétiques.

- La figure 7 représente des courbes de dilution de cerveau de souris, de vache et d'homme atteints par une ESST. Elle illustre la capacité du procédé selon l'invention à effectuer le diagnostic de toutes les ESSTs.

**EXEMPLE 1 : Procédé de détection selon l'invention : optimisation de différents**

10 **paramètres**

**1. Couplage du plasminogène sur support solide Covalink NH**

Le plasminogène est immobilisé de façon covalente à la surface de plaques de microtitration Covalink NH (Nunc) à l'aide d'un agent couplant homobifonctionnel, le disuccinimidyl suberate (DSS). 100 µl d'une solution de DSS (12,5mg de DSS dissous dans 50 ml de DMSO et 50 ml de tampon carbonate 50 mM pH 9,5) sont incubés à la surface des puits Covalink NH pendant 1 heure à température ambiante.

Les puits sont lavés 3 fois à l'eau distillée puis 100 µl d'une solution de plasminogène à 2,5 µg/ml en tampon carbonate 50 mM pH 9,5 sont incubés à la surface des puits pendant une nuit à température ambiante. Les puits sont vidés et saturés avec du tampon EIA (tampon phosphate 0,1 M pH 7,4 NaCl 0,15 M, BSA 0,1% et azoture de sodium 0,01%)

20 **2. Préparation de l'échantillon (étape (a) du procédé) et capture de la PrP<sup>res</sup> sur les plaques de microtitration Covalink NH contenant le plasminogène (étape (b) du procédé)**

**A. Conditions de préparation de l'échantillon en vue de la capture**

25 µl d'un homogénat de cerveau de mouton atteint de la tremblante (CP = contrôle positif) ou sain (CN = contrôle négatif) sont incubés avec 225 µl de tampon EIA pH 7,4 comprenant un agent tensioactif ionique et de la protéinase K à une concentration finale de 1 µg/ml, pendant 10 minutes à 37°C, puis 10 µl de Pefabloc<sup>TM</sup> (inhibiteur de protéases correspondant au fluorure de [4-(2-aminoéthyl)



benzènesulfonyl] HCl) à 100 mM sont ajoutés. 100 µl d'échantillon sont déposés et incubés 2 heures à température ambiante dans les puits de la plaque de microtitration Covalink NH contenant le plasminogène.

5     B. Effet des agents tensioactifs sur la capture de la PrP<sup>res</sup> par le plasminogène immobilisé sur support solide Covalink NH

Le Tableau I ci-après illustre les résultats obtenus en utilisant l'anticorps BAR-224 pour détecter la PrP<sup>res</sup> associée au plasminogène après dénaturation ménagée par traitement à la guanidine/HCl.

10     Ce Tableau I décrit les conditions testées sur la capture de la PrP<sup>res</sup> par le plasminogène ; Ce Tableau détaille l'effet de différents agents tensioactifs : Sarkosyl= SK, Triton X100= T, NP40= Nonidet P40, Tween 20= Tween et Sodium docécyl sulfate= SDS.

**Tableau I : Effet des détergents sur la capture de la PrP<sup>res</sup> de cerveau de mouton atteint de la tremblante par le plasminogène immobilisé sur support solide plaque de microtitration Covalink NH.**

Composition des tampons d'incubation	CN	CP	CP/CN
Tampon EIA + SK 0,5%	0,066	2,435	37,17
Tampon EIA + SK 0,5% + T 0,5%	0,054	1,857	34,38
Tampon EIA + SK 0,5% + T 1%	0,006	0,837	139,42
Tampon EIA + SK 0,5% + T 2%	0,000	0,550	-
Tampon EIA + SK 1%	0,035	1,671	48,42
Tampon EIA + SK 1% + T 0,5%	0,079	1,942	24,58
Tampon EIA + SK 1% + T 1%	0,097	1,997	20,58
Tampon EIA + SK 1% + T 2%	0,003	0,851	340,20
Tampon EIA + SK 1,5%	0,020	1,428	71,40
Tampon EIA + SK 1,5% + T 0,5%	0,103	1,725	16,82
Tampon EIA + SK 1,5% + T 1%	0,062	1,976	32,13
Tampon EIA + SK 2%	0,003	0,804	267,83
Tampon EIA + SK 2% + T 0,5%	0,022	1,430	66,49
Tampon EIA + SK 2% + T 1%	0,026	1,731	67,88
Tampon EIA + SK 2% + T 2%	* 0,037	1,88	50,81
Tampon EIA + T 1%	0,000	0,027	-
Tampon EIA + T 2%	0,000	0,354	-
Tampon EIA + T 4%	0,006	0,936	170,18
Tampon EIA + T 10%	* 0	1,018	-
Tampon EIA + T 15%	* 0	0,305	-
Tampon EIA + SDS 0,5%	0,017	0,095	5,59
Tampon EIA + SDS 1%	0,000	0,008	-
Tampon EIA + NP40 3%	0,001	0,779	779,00
Tampon EIA + NP40 3% + Tween 3%	0,000	0,905	-
Tampon EIA + NP40 6%	0,013	0,801	64,08
PBS + NP40 3% + Tween 3%	□ 0,004	0,526	150,29
Tampon EIA + DOC 1%	* 0,03	0,014	0,47
Tampon EIA + SK1% + DOC	* 0,011	0,974	88,55

5 \* : Résultats obtenus dans une expérience différente et normalisés par rapport au résultat obtenu avec le tampon EIA + SK 1 %

□ : Conditions de la Demande Internationale WO 01/23425 utilisées pour la capture de la PrP<sup>res</sup> par le plasminogène.

CN : contrôle négatif

10 CP : contrôle positif

Tampon EIA : tampon phosphate 0,1M pH 7,4 + NaCl 0,15 M + BSA 0,1% + azoture de sodium 0,01%

Les conditions de capture sélectionnées pour la suite des essais sont : tampon EIA + SK 1 %, même si dans le Tableau I ci-dessus, d'autres conditions

présentent un rapport CP/CN légèrement supérieur parce que ces conditions fournissent un différentiel CP-CN fort et que dans d'autres expériences les résultats étaient inversés, la valeur des CN variant.

En l'absence d'agent tensioactif, aucune capture spécifique n'est observée (on observe même une liaison de la PrP<sup>sens</sup>).

Les meilleurs résultats sont obtenus en utilisant comme agent tensioactif, le sarkosyl.

C. Effets du pH et de la concentration en NaCl sur la capture de la PrP<sup>res</sup> par le plasminogène immobilisé sur support solide Covalink NH

25 µl d'un homogénat de cerveau de mouton atteint de la tremblante ou sain sont incubés avec 225 µl de tampon EIA contenant différentes concentrations de NaCl et à différents pH et comprenant du sarkosyl à une concentration finale (p/v) de 1 % et de la protéinase K à une concentration finale de 1 µg/ml, pendant 10 minutes à 37°C, puis 10 µl de Pefabloc™ à 100 mM sont ajoutés. On procède ensuite comme décrit précédemment.

Le Tableau II illustre les résultats obtenus.

**Tableau II : Effet du pH et de la concentration en NaCl sur la capture de la PrP<sup>res</sup> de cerveau de mouton atteint de la tremblante par le plasminogène immobilisé sur une plaque de microtitration Covalink NH.**

Composition des tampons d'incubation	CN	CP	CP/CN
Tampon EIA pH 6 + NaCl 0,15 M + SK 1%	0,032	0,515	16,33
Tampon EIA pH 6 + NaCl 0,3M+ SK 1% *	0,033	0,559	16,94
Tampon EIA pH 6 + NaCl 0,5M+ SK 1% *	0,058	0,499	8,60
Tampon EIA pH 6 + NaCl 0,8M+ SK 1% *	0,168	0,727	4,33
Tampon EIA pH 6,5 + NaCl 0,15 M + SK 1%	0,080	0,541	6,76
Tampon EIA pH 7 + NaCl 0,15 M + SK 1%	0,090	0,561	6,23
Tampon EIA pH 7,4 + SK 1%	0,093	0,454	4,91
Tampon EIA pH 8 + NaCl 0,15 M + SK 1%	0,086	0,326	3,78
Tampon EIA pH 7,4 + SK 1%	0,068	0,076	1,12
Tampon EIA pH 7,4 + NaCl 0,5 M + SK 1%	0,051	0,722	14,15
Tampon EIA pH 7,4 + NaCl 1 M + SK 1%	0,100	0,518	5,20

\* : Résultats obtenus dans une expérience différente et normalisés par rapport au résultat obtenu avec le tampon EIA + SK1%

Tampon EIA : tampon phosphate 0,1M pH 7,4 + BSA 0,1% + azoture de sodium 0,01%

Les conditions de capture de la PrP<sup>res</sup> sélectionnées de préférence sont les suivantes : tampon EIA + NaCl 0,5 M + SK 1%.

**D. Effet de la concentration en protéinase K sur le rapport CP/CN**

25 µl d'un homogénat de cerveau de mouton atteint de tremblante ou  
5 sain sont incubés avec 225 µl de tampon EIA pH 7,4 comprenant 0,5 M de NaCl, 1% final de sarkosyl et de la protéinase K à différentes concentrations, 0, 0,5, 1, 2, 4, et 8 µg/ml finale pendant 10 minutes à 37°C, puis 10 µl de Pefabloc™ à 100 mM sont ajoutés. On procède ensuite comme décrit précédemment.

Le Tableau III et la figure 1 illustrent les résultats obtenus.

10 **Tableau III : Optimisation de la concentration en protéinase K (PK)**

Concentration de la PK en µg/ml	CN	CP	CP/CN
0	0,133	1,107	8,32
0,5	0,178	1,921	10,79
1	0,240	2,125	8,87
2	0,162	2,064	12,74
4	0,108	1,871	17,40
8	0,103	1,661	16,20

Ces résultats montrent que la PK à faible concentration (2 à 4 µg/ml) améliore le rapport CP/CN, tout en conservant un bon signal CP.

15 **3. Dénaturation ménagée de la PrP<sup>res</sup>, dans des conditions où le complexe plasminogène/PrP<sup>res</sup> n'est pas dissocié.**

**A. Conditions préférées de la dénaturation**

Après 2 heures de réaction à température ambiante, les puits sont lavés puis incubés avec 100 µl de guanidine/HCl 8M pendant 30 min à 37°C.

20 **B. Effet de l'agent dénaturant utilisé après capture et avant détection de la PrP<sup>res</sup>, par un anticorps marqué**

25 µl d'un homogénat de cerveau de mouton scrapie et mouton sain sont incubés avec 225 µl de tampon EIA pH 7,4 comprenant 0,5 M de NaCl, 1% de sarkosyl et de la protéinase K à une concentration finale de 1 µg/ml pendant 10 minutes à 37°C, puis 10 µl de Pefabloc™ à 100 mM sont ajoutés. 100 µl sont déposés  
25 dans les puits d'une plaque de microtitration contenant du plasminogène immobilisé.

Après 2 heures de réaction à température ambiante, les puits sont lavés puis incubés avec 100  $\mu$ l de différents agents dénaturants pendant 30 min à 37°C.

Les puits sont à nouveau lavés puis incubés avec un anticorps  
5 traceur, le BAR224 à 5 unités Ellman/ml, pendant 2 heures à température ambiante.

Après lavage, 200  $\mu$ l d'une solution de révélation (réactif d'Ellman) sont ajoutés. L'absorbance à 414 nm des puits est mesurée après 30 min de réaction.

Le Tableau IV illustre les résultats obtenus.

**Tableau IV : Effet de l'agent dénaturant utilisé après capture et avant détection  
de la PrP<sup>res</sup> de mouton par un anticorps marqué.**

Agents dénaturants	CN	CP	CP/CN
Urée 2M	0,056	0,082	1,46
Urée 4M	0,055	0,116	2,11
Urée 8M	0,056	0,295	5,27
Guanidine/HCl 2M	0,108	0,12	1,11
Guanidine/HCl 4M	0,083	0,2	2,41
Guanidine/HCl 8M	0,122	1,445	11,84
NaSCN 2M	0,118	0,09	0,76
NaSCN 4M	0,054	0,103	1,91
NaSCN 8M	0,025	0,918	36,72
Guanidine/SCN 2M	* 0,072	0,347	4,82
Guanidine/SCN 4M	* 0,024	0,394	16,42
Guanidine/SCN 6M	* 0,016	0,881	55,06
NaNO <sub>3</sub> 2M	0,103	0,097	0,94
NaNO <sub>3</sub> 4M	0,084	0,09	1,07
NaOH 1M	0,038	0,01	0,26
NaOH 0,5M	0,023	0,074	3,22
NaOH 0,1M	0,031	0,175	5,65
HCl 1M	0,092	0,125	1,36
HCl 0,5M	0,079	0,136	1,72
HCl 0,1M	0,057	0,071	1,25
NaCl 2M	0,085	0,07	0,82
NaCl 4M	0,063	0,064	1,02
HFIP 50%	0,026	0,309	11,88
Méthanol	0,021	0,027	1,29
Isopropanol	0,059	0,049	0,83
Ethanol	0,042	0,035	0,83
Acétonitrile 50%	0,02	0,023	1,15
DMSO 50%	0,014	0,02	1,43
SDS 0,5%	0,003	-0,006	-
SDS 1%	0,001	0	0,00
SDS 5%	-0,004	-0,007	1,75
SDS 10%	-0,008	-0,009	1,13
DOC 5%	0,088	0,09	1,02
DOC 10%	0,107	0,094	0,88
TX-100 20%	0,021	0,021	1,00
SK 5%	-0,011	-0,012	1,09
SK 10%	0,011	-0,013	-
SK 20%	0,019	0,005	0,26
Chaps 2%	0,014	0,012	0,86
Tp citrate 0,1M pH3,5	0,017	0,022	1,29
Tp glycine 0,1M pH3,5	0,013	-0,001	-
HFIP 10%	-0,004	-0,002	0,50
Tp EIA	0,016	-0,005	-

\* : Résultats obtenus dans une expérience différente et normalisés par rapport au

5 résultat obtenu avec le tampon EIA + SK 1%

Seules certaines conditions testées donnent un bon signal CP : ce sont toujours des agents chaotropes forts qui donnent une bonne détection de la PrP<sup>res</sup>, comme l'urée, l'hydrochlorure de guanidine, le thiocyanate de guanidine et le thiocyanate de sodium.

5 **4. Détection de la PrP<sup>res</sup> complexée au plasminogène directement sur le support solide: sélection de l'anticorps de révélation**

On procède comme décrit au point 3., en utilisant comme agent dénaturant la guanidine/HCl 8M.

Huit Anticorps ont été testés à une concentration de 5 unités  
10 Ellman/ml : SAF34, SAF53, SAF61, 8G8, BAR221, BAR224, BAR231 et BAR233.

Le Tableau V illustre les résultats obtenus.

**Tableau V : Sélection de l'anticorps traceur pour la détection de la PrP<sup>res</sup> de mouton.**

Traceur	CN	CP	CP/CN
SAF34	0,082	2,163	26,37
SAF53	0,381	2,285	6,01
SAF61	0,372	2,385	6,41
8G8	0,160	1,014	6,36
BAR221	0,039	1,133	29,04
BAR224	0,015	2,121	146,24
BAR231	0,020	0,153	7,85
BAR233	0,042	0,767	25,98

15 L'anticorps traceur BAR224 donne le meilleur rapport CP/CN ainsi qu'un bon signal CP pour la détection de la PrP<sup>res</sup> de mouton.

**EXEMPLE 2 : Etude comparative de la détection de la PrP<sup>res</sup> de mouton à l'aide d'un dosage « sandwich » classique (BAR224/SAF34) ou avec le couple plasminogène/BAR224.**

20 Cette étude a permis de comparer la sensibilité de détection des deux types de sandwich. Une préparation de PrP<sup>res</sup> (SAF) a été obtenue à partir d'un cerveau de mouton atteint de tremblante :

25 - Pour le dosage « sandwich » BAR224/SAF34 : les préparations de SAFs (selon le protocole des SAFs rapides, tel que décrit dans la Demande internationale PCT WO 99/41280) à partir de 250 µl d'homogénat de cerveau de mouton atteint de la tremblante ou sain, sont reprises et dénaturées avec 25 µl d'un tampon dénatu-

rant (tampon C, tel que défini dans la Demande internationale PCT WO 99/41280) pendant 10 min à 100°C. Les culots sont repris avec 250 µl de tampon EIA et dilués successivement en tampon EIA. Les dilutions sont déposées dans les puits d'une plaque de microtitration contenant l'anticorps BAR224. Après 2 heures de réaction à 5 température ambiante, les puits sont lavés puis incubés avec 100 µl de l'anticorps traceur SAF34 (à 5 UE/ml) pendant 2 heures à température ambiante. Après lavage, 200 µl de la solution de révélation sont ajoutés. L'absorbance à 414 nm est mesurée après 30 minutes de réaction.

- Pour le dosage « sandwich » plasminogène/BAR224 : les préparations de SAFs (identiques à ci-dessus) sont reprises avec 250 µl de tampon EIA contenant du Pefabloc™ 4 mM finale, puis traitées par ultrasons jusqu'à dissolution du culot. On effectue ensuite des dilutions successives en tampon EIA comprenant du Pefabloc™. Les dilutions sont déposées sur support solide (plaque de microtitration) contenant du plasminogène. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, les 15 puits sont lavés ; après l'étape de lavage, la PrP<sup>res</sup> est dénaturée de façon ménagée par de la guanidine/HCl (8M, 30 minutes à 37°C) puis les différents puits sont incubés avec 100 µl de l'anticorps traceur BAR224 (à 5 UE/ml) pendant 2 heures à température ambiante. Après lavage, 200 µl de solution de révélation sont ajoutés. L'absorbance à 414 nm est mesurée après 30 minutes de réaction.

20 La Figure 2 illustre les résultats obtenus et montre que les deux systèmes présentent une sensibilité comparable avec un léger avantage pour le dosage entièrement immunologique.

**EXEMPLE 3 : Etude comparative du dosage de la PrP<sup>res</sup> de mouton atteint de la tremblante en utilisant la technique selon la Demande internationale PCT WO 99/41280 et le dosage « sandwich » plasminogène/BAR224 sur plaque de micro-**  
25 **titration, selon l'invention.**

Dans cette deuxième expérience, on compare la sensibilité des deux procédés en incluant, pour le procédé selon la Demande WO 99/41280, la technique de préparation des SAFs et pour la technique plasminogène, la dilution qu'il est nécessaire d'opérer avant capture, notamment pour obtenir une concentration en protéine, 30 dans l'homogénat, de 20 mg/ml (2% p/v).



Un homogénat à 20% de cerveau de mouton atteint de la tremblante est dilué ou non dans un homogénat de cerveau de mouton sain (dilution 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320).

Dans le cas du test selon la Demande internationale WO 99/41280, les SAFs sont préparés à partir de 250 µl d'homogénat. Pour la partie détection, les anticorps BAR224 et SAF34 sont utilisés comme anticorps de capture et anticorps traceur respectivement.

Dans le cas du test selon l'invention :

le plasminogène est immobilisé sur les plaques de microtitration comme précisé à l'exemple 1 ;

le dosage est effectué à partir de 25 µl d'homogénat, en utilisant comme tampon de capture, du tampon EIA comprenant 0,5 M de NaCl, 1% de sarkosyl et 2,5 µg/ml de protéinase K, comme agent dénaturant de la guanidine/HCl 8M et comme anticorps traceur le BAR224.

Les résultats sont illustrés à la figure 3 et montrent que le test selon la Demande internationale PCT WO 99/41280 a un avantage très net en termes de sensibilité parce qu'il traite 250 µl d'homogénat à 20%, soit 50 mg de tissu cérébral au lieu de 25 µl du même homogénat à 20%, soit 5 mg pour le test selon l'invention. Cet inconvénient résulte de l'utilisation de plaques de microtitration, parce que le volume d'homogénat à 2% traité est limité (au maximum 300 µl). Toutefois, cet inconvénient disparaît lorsqu'on utilise des billes magnétiques qui permettent de traiter des volumes très importants (au moins 50 ml).

**EXEMPLE 4 : Etude comparative du dosage direct selon l'invention avec un dosage indirect de la PrP<sup>res</sup> de mouton atteint de la tremblante liée au plasminogène immobilisé sur des billes magnétiques. Comparaison avec les conditions de capture utilisées dans la Demande Internationale WO 99/41280.**

- 100 µg de plasminogène ont été couplés à 1 ml de billes magnétiques (Dynal M-280) selon la méthode décrite par le fabricant.

- 25 µl d'un homogénat à 20 % de cerveau de mouton atteint de la tremblante ou sain sont incubés :

(1) soit avec 225 µl de tampon de capture, tel que défini ci-dessus

(2) soit avec 225 µl de PBS comprenant 3% de NP-40 et 3% de Tween-20 (conditions décrites dans la Demande internationale PCT WO 01/23425).

- 10 µl de billes, couplées au plasminogène, sont ajoutés à chaque échantillon puis incubés 2 heures à température ambiante sous rotation. Les billes sont  
5 lavées 3 fois :

. soit (1) avec du tampon EIA comprenant 1% de Tween 20,

. soit (2) avec du PBS comprenant 2% de NP-40 et 2% de Tween 20.

Après un lavage avec du PBS, on ajoute 30 µl de guanidine/HCl 6M pour le dosage direct et 30 µl d'urée 6 M et sarkosyl 0,25% pour le dosage indirect,  
10 puis on incube pendant 10 minutes à 100°C.

Les résultats sont illustrés à la figure 4 :

. Dans le cas du dosage direct, après l'étape de dénaturation, les billes couplées au plasminogène sont lavées puis incubées avec 500 µl de traceur BAR224 en tampon EIA/Tween 20 1% (à 5 UE/ml) pendant 2 heures à température  
15 ambiante sous agitation. Les billes sont ensuite lavées 2 fois avec du tampon EIA/Tween 20 1% et une fois avec du PBS, avant d'ajouter 600 µl de réactif d'Ellman. Après 30 minutes de réaction, 200 µl de milieu réactionnel sont prélevés et l'absorbance à 412 nm est mesurée.

. Dans le cas du dosage indirect, après l'étape de dénaturation, la PrP  
20 dénaturée et éluée du plasminogène est reprise avec 300 µl de tampon EIA et mesurée à l'aide d'un dosage « sandwich » BAR224/SAF34.

Il ressort de cet exemple que les conditions de capture selon la présente invention permettent d'obtenir des résultats significativement supérieurs à ceux obtenus avec les conditions de capture de la Demande Internationale WO  
25 01/23425. On notera aussi que le dosage direct, plus simple est aussi plus sensible.

**Exemple 5 : Comparaison de la détection de la PrP<sup>res</sup> utilisant la technique de préparation de SAFs suivie par un dosage immunométrique (méthode selon la Demande Internationale WO 99/41280) avec celle utilisant la capture de la PrP<sup>res</sup> sur des billes couplées au plasminogène suivie d'un dosage direct.**

30 Dans le cas du dosage de la PrP<sup>res</sup> selon la méthode décrite dans la Demande Internationale PCT WO 99/41280, les SAFs sont préparés à partir de 500 µl

d'homogénat à 20% de cerveau de mouton sain ou atteint de la tremblante (dilué ou non dans un homogénat de cerveau de mouton sain au 1/10, 1/50 et 1/100). Les culots de SAFs sont repris et dénaturés avec 50 µl de tampon de dénaturation (tampon C, tel que défini dans la Demande internationale PCT WO 99/41280) pendant 10 minutes à 100°C. La quantité de PrP est ensuite mesurée avec le kit de détection BIO-RAD Platelia™ BSE (réf. 51103) (trousse immuno-enzymatique pour la détection *in vitro* de la PrP<sup>res</sup> après purification selon la méthode décrite dans la Demande Internationale PCT WO 99/41280).

Dans le cas du dosage utilisant le plasminogène couplé à des billes magnétiques, les 500 µl d'homogénat (les mêmes que ci-dessus) sont dilués 10 fois dans du tampon EIA comprenant 0,5M de NaCl et 1% de sarkosyl, puis incubés avec 30 µl de billes contenant le plasminogène immobilisé pendant 3 heures à température ambiante. Après lavage, une dénaturation ménagée est réalisée par traitement avec une solution de guanidine/HCl pendant 10 minutes à 100°C. Après 3 lavages avec du tampon EIA/Tween 20 1% et un lavage avec du PBS, les billes sont incubées avec le traceur BAR224 en tampon EIA pendant 2 heures à température ambiante. Les billes sont à nouveau lavées 3 fois avec du tampon EIA/Tween 20 1% et une fois avec du PBS avant d'ajouter la solution de révélation (réactif d'Ellman).

Les résultats sont illustrés à la figure 5, qui montre que la technique plasminogène apparaît au moins aussi sensible que le test selon la Demande Internationale PCT WO 99/41280. L'utilisation de billes magnétiques permet de travailler avec un volume plus important et de compenser l'inconvénient lié à la nécessité de diluer l'homogénat avant la capture par le plasminogène.

**EXEMPLE 6 : Effet de la dilution d'un homogénat de cerveau de mouton atteint de la tremblante sur la détection de la PrP<sup>res</sup> par dosage direct sur du plasminogène couplé aux billes magnétiques. Démonstration de la capacité de la méthode à concentrer la PrP<sup>res</sup> diluée dans un grand volume d'échantillon.**

500 µl d'un homogénat de cerveau de mouton atteint de la tremblante sont dilués dans 5, 10, 20 et 50 ml de tampon EIA pH 7,4 comprenant 0,5 M de NaCl et 1% de sarkosyl, puis incubés avec 30 µl de billes couplées au

plasminogène pendant 4 heures à température ambiante. Ensuite on procède comme décrit ci-dessus.

Les résultats sont illustrés à la figure 6 qui montre la capacité du procédé selon l'invention à concentrer la PrP<sup>res</sup> diluée.

5 **EXEMPLE 7 : Application de l'invention à la détection de PrP<sup>res</sup> dans des homogénats de cerveaux de souris, de vache et d'homme atteints par une ESST.**

Des homogénats à 20% (p/v) obtenus à partir d'un cerveau de souris (infectée par une souche de tremblante du mouton), d'un cerveau de bovin (infecté par l'ESB) ou d'un cerveau humain (infecté par la maladie de Creutzfeldt-Jakob) ont été  
10 dilués jusqu'à une concentration de 1% (p/v) dans le tampon de capture (tampon EIA comprenant du NaCl 0,5 M et du sarkosyl à 1% (v/v) final). Ces homogénats ont ensuite été mis au contact de billes magnétiques contenant du plasminogène immobilisé et analysés dans les conditions décrites dans l'exemple 4.

De manière plus précise, on ajoute à 50 µl d'un homogénat de  
15 cerveau contrôle négatif ou positif (dilué ou non dans un homogénat négatif + 50 µl de SK10%), 850 µl de tampon EIA/NaCl 0,5 M + 50 µl de SK10 % + 10 µl de billes magnétiques couplées à du plasminogène ; on incube 2h30 à température ambiante sous rotation ; les billes sont ensuite lavées, 3 fois avec du tampon EIA comprenant 1% de Tween 20, puis une fois avec du PBS. La dénaturation ménagée est effectuée  
20 en présence de 50 µl de thiocyanate de guanidine (Gn/SCN) 4 M à 100°C pendant 8 min. Après l'étape de dénaturation, les billes sont lavées en PBS puis incubées avec 500 µl d'anticorps traceur 2h à température ambiante, sous agitation (à 5 UE/ml). Les billes sont ensuite lavées deux fois avec du tampon EIA/Tween 20 1% et une fois avec du PBS, avant d'ajouter 1 ml de réactif d'Ellman. Après 20 min de réaction, 200 µl de  
25 milieu réactionnel sont prélevés et l'absorbance à 412 nm est mesurée.

Cette expérience (figure 7) montre que le test décrit fonctionne avec d'autres espèces que les moutons et peut détecter d'autres souches de prions que les souches de tremblante.

## REVENDICATIONS

- 1°) Procédé de détection de la PrP<sup>res</sup> dans un échantillon biologique, mettant en œuvre un support solide, notamment des plaques de microtitration ou des billes magnétiques, sur lequel est immobilisé du plasminogène, lequel procédé est
- 5 caractérisé en ce qu'il comprend :
- (a) une étape de préparation de l'échantillon biologique, au cours de laquelle ce dernier est incubé dans un tampon sélectionné dans le groupe constitué par :
- (i) des tampons d'homogénéisation de l'échantillon biologique
- 10 comprenant (1) un tampon sélectionné dans le groupe constitué par les tampons comprenant au moins un agent tensioactif sélectionné dans le groupe constitué par les agents tensioactifs ioniques et les agents tensioactifs non-ioniques, un tampon glucosé, un tampon à base de saccharose et un tampon PBS et (2) optionnellement, une protéinase K à une concentration finale comprise entre 1 et 8 µg/ml, de préférence à une
- 15 concentration finale comprise entre 2 et 4 µg/ml et
- (ii) les tampons de capture comprenant au moins (1) un agent tensioactif sélectionné dans le groupe constitué par les agents tensioactifs ioniques et (2) optionnellement une protéinase K à une concentration finale comprise entre 1 et 8 µg/ml, de préférence à une concentration finale comprise entre 2 et 4 µg/ml ;
- 20 (b) une étape de capture de la PrP<sup>res</sup> sur ledit support solide, effectuée obligatoirement en présence d'un tampon de capture, tel que défini ci-dessus, sans PK, par incubation de l'échantillon biologique obtenu à l'étape (a) avec ledit support sur lequel est immobilisé de façon covalente du plasminogène ;
- (c) une étape de dénaturation ménagée de la PrP<sup>res</sup> fixée sur ledit
- 25 support par l'intermédiaire du plasminogène, comprenant l'incubation de la PrP<sup>res</sup> avec un tampon de dénaturation comprenant au moins un agent chaotrope, à une température comprise entre la température ambiante et 100°C et
- (d) une étape de détection de la PrP<sup>res</sup> dénaturée et fixée sur ledit support avec un anticorps spécifique de la protéine PrP.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent tensioactif ionique mis en œuvre au cours de l'étape (a) ou au cours de l'étape (b) est sélectionné dans le groupe constitué par :

5 - des agents tensioactifs anioniques, tels que le SDS (dodécylsulfate de sodium), le sarkosyl (lauroyl-sarcosine), le cholate de sodium, le désoxycholate de sodium, le taurocholate de sodium ; et

- des agents tensioactifs zwitterioniques, tels que le SB 3-10 (décyl-sulfobétaïne), le SB 3-12 (dodécyl-sulfobétaïne), le SB 3-14 (tétradécyl-sulfobétaïne), le SB 3-16 (hexadécyl-sulfobétaïne), le CHAPS et le désoxyCHAPS.

10 3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que l'agent tensioactif non-ionique, mis en œuvre au cours de l'étape (a) du procédé selon l'invention, est sélectionné dans le groupe constitué par le C12E8 (dodécyl octaéthylène glycol), le Triton X100, le Triton X114, le Tween 20, le Tween 80, le MEGA 9 (nonanoyl méthyle glucamine), l'octylglucoside, le LDAO ( dodécyle  
15 diméthylamine oxyde) ou le NP40.

4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la durée d'incubation de l'étape (a) est comprise entre 5 et 30 minutes à 37°C, de préférence pendant 10 minutes à 37°C.

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4,  
20 caractérisé en ce que le tampon de capture comprend de préférence du sarkosyl à une concentration finale comprise entre 0,5 % et 2 % (p/v), de manière encore plus préférée à une concentration finale en sarkosyl de 1 % (p/v).

6°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le tampon de capture comprend en outre un sel sélectionné de préférence parmi les sels de métaux alcalins.  
25

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit sel est du chlorure de sodium, à une concentration comprise entre 0,15 M et 0,5 M.

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le tampon de capture comprend en outre une protéine et de manière  
30 encore plus préférée, de la sérumalbumine bovine à une concentration de 0,2 mg/ml.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la durée d'incubation de l'étape (b) est comprise entre 1 heure et 4 heures à température ambiante.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que l'étape (b) comprend, en outre, si nécessaire, préalablement à ladite incubation, une dilution de l'échantillon biologique obtenu à l'étape (a) dans ledit tampon de capture, pour obtenir l'ajustement de la concentration en protéine.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'agent chaotrope mis en œuvre au cours de l'étape (c) de dénaturation ménagée est sélectionné dans le groupe constitué par l'urée, un sel de guanidine, tel que l'hydrochlorure de guanidine ou le thiocyanate de guanidine et le thiocyanate de sodium ou un mélange de ceux-ci.

12°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que la durée d'incubation de l'étape (c) est comprise entre 10 et 60 minutes, de préférence soit pendant 30 minutes à 37°C avec les plaques de microtitration soit pendant 10 minutes à 100°C avec les billes magnétiques.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que l'anticorps traceur de l'étape (d) est sélectionné dans le groupe constitué par les anticorps SAF et les anticorps anti-PrP recombinante.

14°) Trousse de diagnostic pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle comprend en association :

- au moins un tampon d'homogénéisation, tel que défini ci-dessus,
- au moins un tampon de capture tel que défini ci-dessus,
- au moins un tampon de dénaturation tel que défini ci-dessus,
- une protéinase K à une concentration finale comprise entre 1 et 8 µg/ml, de préférence à une concentration finale comprise entre 2 et 4 µg/ml, et
- un support solide sur lequel est lié, de manière covalente, du plasminogène.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/02117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 April 2001 (2001-04-05) cited in the application the whole document	1
A	WO 01 35104 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;COMOY EMMANUEL (FR); GRASSI JACQUES) 17 May 2001 (2001-05-17) cited in the application the whole document	1
A	FR 2 774 988 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 20 August 1999 (1999-08-20) cited in the application the whole document	1
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 January 2004

Date of mailing of the international search report

21/01/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Moreno, C



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 03/02117

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 00 29850 A (WALLAC OY ;BIRKETT CHRISTOPHER ROBIN (GB); BBSRC OFFICE (GB); HOPE) 25 May 2000 (2000-05-25) cited in the application the whole document -----</p>	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/02117

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0123425	A	05-04-2001	AU 5241100 A	30-04-2001
			CA 2385743 A1	05-04-2001
			EP 1216258 A1	26-06-2002
			WO 0123425 A1	05-04-2001
			JP 2003514773 T	22-04-2003
			US 2002004586 A1	10-01-2002
			US 2001053533 A1	20-12-2001
WO 0135104	A	17-05-2001	FR 2801106 A1	18-05-2001
			AU 1711901 A	06-06-2001
			BG 106686 A	28-11-2003
			CA 2390891 A1	17-05-2001
			CN 1391652 T	15-01-2003
			EP 1232395 A1	21-08-2002
			WO 0135104 A1	17-05-2001
			HU 0203691 A2	28-03-2003
			JP 2003530541 T	14-10-2003
FR 2774988	A	20-08-1999	FR 2774988 A1	20-08-1999
			AU 761641 B2	05-06-2003
			AU 2430099 A	30-08-1999
			CA 2319687 A1	19-08-1999
			EP 1054897 A1	29-11-2000
			WO 9941280 A1	19-08-1999
			JP 2002503675 T	05-02-2002
			NZ 506225 A	30-05-2003
WO 0029850	A	25-05-2000	EP 1131635 A1	12-09-2001
			WO 0029850 A1	25-05-2000
			JP 2002530650 T	17-09-2002

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02117

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 G01N33/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01 23425 A (FISCHER MICHAEL BORIS ;AGUZZI ADRIANO (CH); UNIV ZUERICH (CH)) 5 avril 2001 (2001-04-05) cité dans la demande le document en entier	1
A	WO 01 35104 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE ;COMOY EMMANUEL (FR); GRASSI JACQUES) 17 mai 2001 (2001-05-17) cité dans la demande le document en entier	1
A	FR 2 774 988 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 20 août 1999 (1999-08-20) cité dans la demande le document en entier	1
-/--		

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

13 janvier 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/01/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Moreno, C

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02117

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 00 29850 A (WALLAC OY ; BIRKETT CHRISTOPHER ROBIN (GB); BBSRC OFFICE (GB); HOPE) 25 mai 2000 (2000-05-25) cité dans la demande le document en entier -----</p>	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/02117

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0123425	A	05-04-2001	AU 5241100 A	30-04-2001
			CA 2385743 A1	05-04-2001
			EP 1216258 A1	26-06-2002
			WO 0123425 A1	05-04-2001
			JP 2003514773 T	22-04-2003
			US 2002004586 A1	10-01-2002
			US 2001053533 A1	20-12-2001
WO 0135104	A	17-05-2001	FR 2801106 A1	18-05-2001
			AU 1711901 A	06-06-2001
			BG 106686 A	28-11-2003
			CA 2390891 A1	17-05-2001
			CN 1391652 T	15-01-2003
			EP 1232395 A1	21-08-2002
			WO 0135104 A1	17-05-2001
			HU 0203691 A2	28-03-2003
			JP 2003530541 T	14-10-2003
FR 2774988	A	20-08-1999	FR 2774988 A1	20-08-1999
			AU 761641 B2	05-06-2003
			AU 2430099 A	30-08-1999
			CA 2319687 A1	19-08-1999
			EP 1054897 A1	29-11-2000
			WO 9941280 A1	19-08-1999
			JP 2002503675 T	05-02-2002
			NZ 506225 A	30-05-2003
WO 0029850	A	25-05-2000	EP 1131635 A1	12-09-2001
			WO 0029850 A1	25-05-2000
			JP 2002530650 T	17-09-2002